

Marlon Cristiano de Borba

**COMPOSTOS BIOATIVOS E FERMENTADOS DE ALGAS
MARINHAS NO CONTROLE DA MURCHA DE FUSARIUM
DO FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.)**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Recursos
Genéticos Vegetais da Universidade
Federal de Santa Catarina para a
obtenção do Grau de Mestre em
Ciências, área de concentração de
Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Marciel J. Stadnik

Coorientador: Dr. Mateus B. de Freitas

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

de Borba, Marlon Cristiano

Compostos bioativos e fermentados de algas marinhas
no controle da Murcha de Fusarium do feijoeiro
(*Phaseolus vulgaris* L.) / Marlon Cristiano de Borba ;
orientador, Marciel João Stadnik ; coorientador, Mateus
Brusco de Freitas. - Florianópolis, SC, 2017.

56 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de
Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais,
Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. *Fusarium oxysporum*
f. sp. *phaseoli*. 3. Indutores de resistência. 4. Ulvana.
I. Stadnik, Marciel João. II. de Freitas, Mateus Brusco.
III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. IV.
Título.

**Compostos bioativos e fermentados de algas
marinhas no controle da Murcha de Fusarium
do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**

por

Marlon Cristinao de Borba

Dissertação julgada e aprovada em 22/02/2017, em sua forma final,
pelo Orientador e Membros da Banca Examinadora, para obtenção
do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração Recursos
Genéticos Vegetais, no Programa de Pós-Graduação em Recursos
Genéticos Vegetais, CCA/UFSC.

Banca Examinadora:




Prof. Dr. Marciel João Stadnik (Presidente-CCA/UFSC)



Dr. João Américo Wordelt Filho (Externo-EPAGRI/SC)



Prof. Dr. Paulo Emílio Lovato (Interno-CCA/UFSC)



Prof. Dr. Robson Marcelo Di Piero (Interno-CCA/UFSC)



Prof. Dr. Paulo Emílio Lovato (Coordenador do Programa)

Florianópolis, fevereiro de 2017

*Aos meus queridos familiares pelo
apoio em todos os momentos.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais (RGV) pela oportunidade de realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

Ao professor Marciel J. Stadnik por seus ensinamentos, confiança e incentivo ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu coorientador Mateus B. de Freitas pela amizade, ensinamento e suporte dado durante todo o mestrado.

Aos amigos do grupo de estudos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, Felipe R. Garcés Fiallos, Felipe M. de Quadros e Fernando Dacoregio pelo apoio e parceria durante a realização do trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Fitopatologia da UFSC por toda colaboração, amizade e convivência.

Aos meus pais, que nunca mediram esforços para a realização dos meus sonhos, agradeço todo amor, compreensão e incentivo ao longo da minha vida.

A minha irmã Marcieli e ao meu irmão Rodrigo por permanecerem sempre ao meu lado, nos bons e maus momentos.

A minha tia Rosemari pelo incentivo, carinho e paciência durante todo o mestrado.

A minha querida Helena por todo o amor envolvido.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos, o meu muito obrigado!

*“Não reclame se a terra não é boa;
Que o clima não é favorável;
Não lhe cabe julgar a terra ou o tempo;
Tua missão é semear”
Vade Bernarski.*

COMPOSTOS BIOATIVOS E FERMENTADOS DE ALGAS MARINHAS NO CONTROLE DA MURCHA DE FUSARIUM DO FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.)

RESUMO

A Murcha de Fusarium (MF), causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (*Fop*), é uma das principais doenças do feijoeiro. Embora a resistência genética seja a sua principal forma de controle, o desenvolvimento e lançamento de novas cultivares tem sido dificultado pela variabilidade do patógeno. Neste cenário, novas alternativas de controle precisam ser consideradas. O presente trabalho teve por objetivo avaliar o potencial de compostos bioativos e fermentados de algas marinhas no controle da MF do feijoeiro, bem como seu efeito na emergência de plântulas. Inicialmente, quinze compostos foram testados em casa-de-vegetação usando tratamentos de semente, solo e folha. As sementes foram embebidas por 4 h antes da semeadura, enquanto que a irrigação do solo e a pulverização foliar foram realizadas em plantas com as primeiras folhas totalmente expandidas, aos 12 dias após a semeadura. Dentre os compostos testados, somente a ulvana reduziu a intensidade da doença quando pulverizada sobre as folhas e aumentou a emergência de plântulas quando embebida via semente. Em um segundo experimento, foi comparado o efeito da frequência de pulverizações de ulvana no progresso da doença e na colonização do fungo. Adicionalmente, foi testado o efeito do tratamento de semente com ulvana na emergência de plântulas em solo infestado com *Fop*, esterilizado/não-infestado e não-esterilizado/não-infestado. Uma, duas ou três aplicações de ulvana similarmente protegeram as plantas de feijão contra *Fop* até o terceiro trifólio expandido. A partir deste estágio, *Fop* eficientemente colonizou epicótilos de feijão independente do tratamento. A pulverização foliar de ulvana reduziu o progresso da doença comparado as plantas controle, mas não afetou a intensidade final no estágio de enchimento de vagens. Ulvana aumentou a emergência de plântulas em todas as condições testadas, mostrando ser um eficiente tratamento promotor de crescimento no feijão.

Palavras-chave: *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Indutores de resistência. Ulvana. Emergência de plântulas. Colonização vascular.

BIOACTIVE COMPOUNDS AND FERMENTED SEaweEDS TO CONTROL THE BEAN FUSARIUM WILT (*Phaseolus vulgaris* L.)

ABSTRACT

The Fusarium wilt (Fw), caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (*Fop*), is one of the most diseases of common bean worldwide. Although the genetic resistance have been the main recommended measure, the development and release of new bean cultivars has been difficult because of the high pathogen variability. In this scenario, new strategies of disease control need to be encouraged. The present study was aimed at evaluating the potential of bioactive compounds and fermented seaweeds in controlling the bean Fw as well as their effect in seedling emergence. Initially, fifteen compounds were screened under greenhouse conditions by using seed, soil and leaf treatments. Seed soaking was carried out for 4 hours previous to sowing, whereas soil irrigation or foliar spraying were performed at the first leaf growth stage (12 days after sowing). Among the tested compounds, only ulvan reduced disease intensity when sprayed onto leaves and increased seedling emergence when soaked in seeds. The effect of ulvan spray frequency was analyzed in follow-up assays on Fw progress and fungal colonization. In addition, seedling emergence was tested in *Fop*-infested soil, sterilized/non-infested and non-sterilized/non-infested. One, two or three applications of ulvan similarly protected bean plants until the third trifoliate leaf stage. From this stage, *Fop* efficiently colonized epicotyls of bean plants independently of treatment. Foliar spraying of ulvan reduced disease progress compared to control but did not affect the final intensity at pod filling growth stage. Ulvan showed to be an effective growth-promoting treatment by increased seedling emergence in all tested conditions.

Keywords: *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Resistance inducers. Ulvan. Seedling emergence. Vascular colonization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Características morfológicas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Microconídios (a), macroconídios (b), macroconídio em fiálide curta (c), e clamidósporos (d). Barras: a-b:30µm; c: 10µm; d: 20µm... 29

Figura 1.2. Sintomas da Murcha de Fusarium em plantas de *Phaseolus vulgaris* causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* Planta com sintoma de murcha (a), planta morta (b), necrose vascular do xilema (c) e esporulação pardo-avermelhada do fungo em hastes (d)..... 31

Figura 2.1. Diagrama mostrando como a fermentação foi realizada. EF = extrato fermentado. UF = ulvana derivada da fermentação. UR = ulvana residual. 39

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Intensidade da Murcha de Fusarium em plantas de feijão aos 52 dias após a semeadura (terceiro trifólio totalmente expandido) em solo infestado com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em casa-de-vegetação tratadas com compostos bioativos e fermentados de algas marinhas. ... 43

Tabela 2.2. Emergência de plântulas de feijão aos 10 dias após a semeadura (primeiras folhas totalmente expandidas) em solo naturalmente infestado com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em casa-de-vegetação..... 44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AACPD	Área abaixo da curva de progresso da doença
ASM	Acibenzolar-S-methyl
BDA	Batata dextrose ágar
DAS	Dias após a semeadura
DAT	Dias após o tratamento
EF	Extrato fermentado
<i>Fop</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>
Fw	Fusarium wilt
MF	Murcha de Fusarium
UF	Ulvana derivada da fermentação
UFC	Unidades formadoras de colônias
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UR	Ulvana residual

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	23
2.	OBJETIVOS.....	25
2.1.	GERAL	25
2.2.	ESPECÍFICOS	25
3.	CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA	27
3.1.	CULTURA DO FEIJOEIRO	27
3.2.	FATORES QUE AFETAM A CULTURA DO FEIJOEIRO	28
3.3.	MURCHA DE FUSARIUM	28
3.3.1.	Etiologia	29
3.3.2.	Taxonomia	30
3.3.3.	Sintomatologia	30
3.3.4.	Controle.....	32
3.4.	INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA	32
3.5.	USO DE INDUTORES DE RESISTÊNCIA	33
4.	CAPÍTULO 2 – SCREENING DE INDUTORES DE RESISTÊNCIA NO CONTROLE DA MURCHA DE FUSARIUM DO FEIJOEIRO (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)*	37
4.1.	INTRODUÇÃO	38
4.2.	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.3.	RESULTADOS.....	42
4.4.	CONCLUSÃO	45
4.5.	REFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
6.	REFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O feijão desempenha um importante papel social e econômico no Brasil, servindo como a principal fonte de proteína na dieta de milhões de pessoas. O país destaca-se mundialmente como um dos principais produtores e consumidores desta leguminosa, com uma produção de mais de três milhões de toneladas em 2014 (FAO, 2017). Contudo, perdas relacionadas a doenças vêm ameaçando a segurança alimentar regional. A Murcha de Fusarium (MF), causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, é uma das principais doenças do feijão, e tem se tornado um problema crescente principalmente pelo plantio sucessivo em áreas de monocultura (WORDELL FILHO et al., 2013; XUE et al., 2015).

A MF é uma doença difícil de ser controlada, pois o fungo apresenta variabilidade genética, pode permanecer saprofiticamente em restos culturais ou sobreviver na ausência do hospedeiro por longo período de tempo, formando esporos de resistência chamados de clamidósporos (ABAWI; PASTOR-CORRALES, 1990). Os principais métodos de controle são a rotação de cultura e o uso de genótipos resistentes (SARTORATO; RAVA, 1994), contudo, poucos são os materiais resistentes comercialmente disponíveis no mercado.

Atualmente, oligo e polissacarídeos algais vêm sendo estudados quanto a sua capacidade de atuar na regulação do crescimento e desenvolvimento de plantas e, na indução de mecanismos de defesa contra estresses bióticos e abióticos (WALTERS et al., 2013). A ulvana, por exemplo, um polissacarídeo extraído de algas do gênero *Ulva*, tem potencial para controlar a ferrugem (BORSATO et al., 2010), a antracnose (PAULERT et al., 2009; DE FREITAS; STADNIK, 2012) e o oídio (JAULNEAU et al., 2011) do feijoeiro. Além disso, tem mostrado capacidade de induzir respostas de defesa em outras espécies, tais como em macieira no controle da mancha foliar de *Glomerella* (ARAÚJO et al., 2008) em trigo e cevada contra o oídio (PAULERT et al., 2010) e, em tomate contra *Fusarium oxysporum* (EL MODAFAR et al., 2012).

Diante dos resultados promissores e da carência de genótipos resistentes à MF, a indução de resistência pode ser uma alternativa complementar para o manejo integrado desta doença. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de compostos bioativos e fermentados de algas marinhas no controle da Murcha de Fusarium do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), e seu efeito na emergência de plântulas.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Avaliar o potencial de compostos bioativos e fermentados de algas marinhas no controle da Murcha de Fusarium (MF) do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), e seu efeito na emergência de plântulas.

2.2. ESPECÍFICOS

- Testar e comparar o efeito da embebição de semente, da irrigação do solo e da pulverização foliar com compostos bioativos e fermentados de algas marinhas no controle da MF do feijoeiro.
- Avaliar o efeito da embebição de semente com compostos bioativos e fermentados de algas marinhas na emergência de plântulas de feijão.
- Avaliar o efeito do número de aplicações de ulvana no progresso da doença e colonização do fungo em plantas de feijão.

3. CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA

3.1. CULTURA DO FEIJOEIRO

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma leguminosa pertencente à família *Fabaceae*, subfamília *Faboideae* (VILHORDO et al., 1996). É uma planta anual, diplóide, com 22 cromossomos, onde se predomina a autopolinização (95%). Dentro do gênero *Phaseolus*, existem mais de 70 espécies já identificadas, porém apenas cinco são cultivadas: o feijão comum (*P. vulgaris*), o feijão de lima (*P. lunatus*), o feijão ayocote (*P. coccineus*), o feijão tepari (*P. acutifolius*), e o *P. polyanthus* (EMBRAPA, 2008). *P. vulgaris* é a espécie com maior distribuição mundial, sendo cultivada nos trópicos e também nas zonas temperadas dos hemisférios norte e sul, sendo responsável por mais de 85% da produção (SINGH, 2001; ACOSTA-GALLEGOS et al., 2007). A domesticação ocorreu em dois centros de origem, na Mesoamérica (México e América Central) e na região dos Andes (sul do Peru, Bolívia e norte da Argentina) há aproximadamente 7000 anos (SINGH, 2001).

Esta leguminosa possui ciclo variando entre 60 e 120 dias e pode apresentar duas formas de crescimento: determinado ou indeterminado. O hábito de crescimento determinado caracteriza-se por ter o caule e os ramos laterais terminando em uma inflorescência e possuir um número limitado de nós, onde a floração tem início do ápice para a base da planta. O hábito indeterminado é caracterizado por possuir um caule principal com crescimento contínuo, numa sucessão de nós e entrenós; as inflorescências são axilares, isto é, desenvolvem-se nas axilas das folhas, e a floração começa da base para o ápice da planta (SILVA, 2011).

O feijão desempenha um importante papel social e econômico na África e América Latina, servindo como a principal fonte de proteína na dieta de milhões de pessoas que vivem nestas regiões. Possui ainda bom conteúdo de carboidratos, vitaminas, ferro e ácidos graxos livres (linoleico e linolênico), além de fornecer grande quantidade de fibras (BROUGHTON et al., 2003; SINGH & SINGH 1992). Segundo informações da FAO (2015), as Américas respondem por 39% do consumo mundial, seguidas pela Ásia (38%), África (19%), Europa (3%) e Oceania (1%). O maior consumo per capita desta leguminosa encontra-se em Burundi com 29 Kg/per capita/ano, enquanto que o Brasil ocupa a sexta colocação com 17 kg/per capita/ano (FAO, 2015).

Myanmar é o maior produtor mundial de feijão (4,6 milhões de toneladas na safra de 2014), seguido da Índia (4,1 milhões de toneladas),

Brasil (3,3 milhões de toneladas), Estados Unidos da América e México (FAO, 2017). Dentre as regiões produtoras no País, destaca-se a região Sul, contribuindo com 33,7% da produção na safra de 2014 (IBGE, 2015). Em 2014, o Estado do Paraná foi responsável pela maior contribuição na produção regional, com 76%, seguido dos Estados de Santa Catarina

(14%) e Rio Grande do Sul (10%) (IBGE, 2015). A cultura ainda apresenta uma baixa produtividade média (1.021 kg/ha na safra de 2014) quando comparado a países como a Irlanda (5.170 kg/ha) e Barbados (6.363 kg/ha) (FAO, 2017), decorrente, principalmente de perdas ocasionadas por doenças.

3.2. FATORES QUE AFETAM A CULTURA DO FEIJOEIRO

Além das perdas ocasionadas por doenças, o rendimento do feijoeiro também é afetado pela condição hídrica do solo e pela temperatura (SILVEIRA; STONE, 2005). O feijoeiro pode consumir de 300 a 450 mm de água durante todo o seu ciclo (PAULA JÚNIOR et al., 2007). A temperatura média ideal para o desenvolvimento da cultura varia de 18 a 24°C, durante o dia e de 15 a 21°C, durante a noite. Sob temperaturas elevadas, próximas de 35°C, a formação de vagens pode ser prejudicada (GRAHAM; RANALLI, 1997).

Limitações à produtividade do feijão também variam de acordo com a região, entre agricultores, fertilidade do solo, estande inicial de plântulas, sistema de cultivo e manejo de plantas daninhas, pragas e doenças (WORDELL FILHO et al., 2013). Ambientes quentes e muitas vezes úmidos dos trópicos e sub-trópicos favorecem o desenvolvimento dos patógenos, enquanto que o plantio de 2-3 ciclos de cultivo consecutivos durante o ano favorece a continuidade do inóculo (GRAHAM; RANALLI, 1997).

3.3. MURCHA DE FUSARUIM

A doença é causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *phaseoli* Kendrick e Snyder (*Fop*) é uma das principais doenças do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Foi relatada pela primeira vez por Echandi (1967) na Costa Rica (cultivar Turrialba 1) e, após alguns anos, foi encontrada em todas as regiões produtoras de feijão do mundo, sendo um sério problema na América Latina, África e noroeste dos Estados Unidos (PASTOR-CORRALES; ABAWI, 1987; BURUCHARA; CAMACHO, 2000). Esta doença está praticamente disseminada em todo

o território nacional, principalmente em áreas de intensa monocultura (WORDELL FILHO et al., 2013).

3.3.1. Etiologia

O fungo produz macroconídios em fiálides curtas, situadas diretamente nas hifas ou ramos finais dos conidióforos, fusiformes com extremidades pontiagudas, ligeiramente curvadas, com parede delgada e presença de dois a cinco septos, medindo 3 a 6 x 25 a 30 μ m (Figura 1.1b-c). *Fop* também produz abundantemente microconídios elípticos (Figura 1.1a) e os clamidósporos, que podem ser intercalares ou terminais (Figura 1.1d), medindo 2 a 4 x 6 a 15 μ m (BIANCHINI et al., 2005).

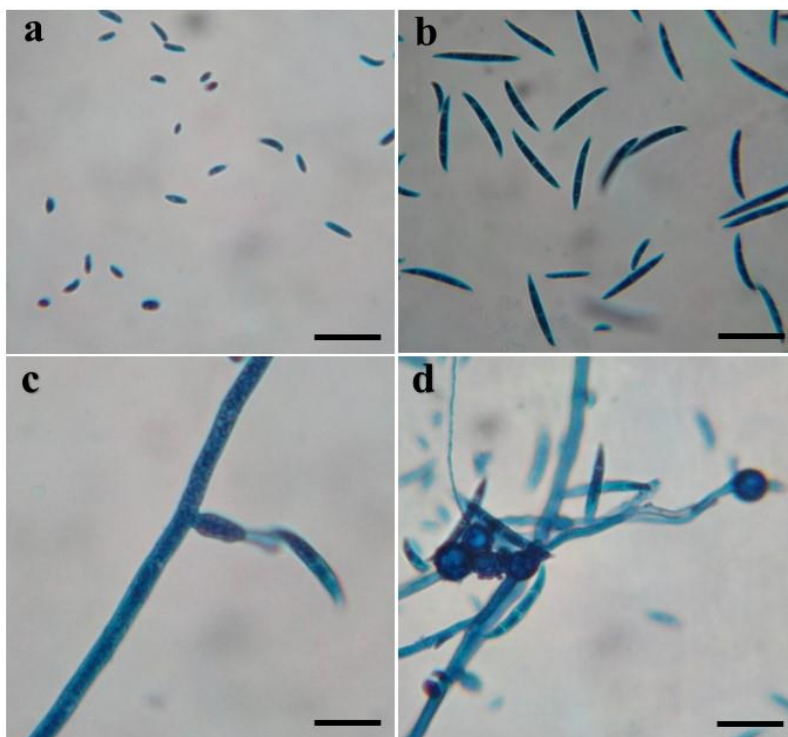


Figura 1.1. Características morfológicas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Microconídios (a), macroconídios (b), macroconídio em fiálide curta (c), e clamidósporos (d). Barras: a-b:30 μ m; c: 10 μ m; d: 20 μ m

As células conidiógenicas são monofiáides curtas denominadas também de falsas cabeças. Uma característica que diferencia *F. solani* de *Fop* é a formação de monofiáides longas (NELSON et al., 1983).

3.3.2. Taxonomia

O fungo *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* é classificado da seguinte forma (AGRIOS et al., 2005; GEISER et al., 2013):

Reino: Fungi

Filo: Ascomycota

Classe: Sordariomycetes

Ordem: Hypocreales

Família: Nectriaceae

Gênero: *Fusarium*

Espécie: *F. oxysporum* Schlechtendahl emend. Kendrick & Snyder

Forma especial: *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*

3.3.3. Sintomatologia

O fungo infecta os sistemas radicular e vascular das plantas e provoca necrose nos vasos do xilema, que adquirem cor pardo-avermelhada, podendo ser observado em um corte transversal do caule (Figura 1.2c). Como consequência à infecção, as plantas exibem amarelecimento progressivo das folhas, iniciando pelas inferiores até alcançar as superiores, sendo facilmente observada nas fases de pré-florescimento e enchimento de grãos (WORDELL FILHO et al., 2013). No campo é possível observar reboleiras de plantas sintomáticas, especialmente em áreas recentemente infestadas (WORDELL FILHO et al., 2013). Quando a infecção é severa, a planta pode secar completamente, e em condições de alta umidade relativa do ar, pode-se observar a esporulação rosada do fungo sobre o caule de plantas mortas (BIANCHINI et al., 2005; Figura 1.2d).

Além desses sintomas, pode-se observar também a produção de vagens vazias, pequenas ou pouco cheias (BURUCHARA; CAMACHO, 2000).



Figura 1.2. Sintomas da Murcha de Fusarium em plantas de *Phaseolus vulgaris* causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* Planta com sintoma de murcha (a), planta morta (b), necrose vascular do xilema (c) e esporulação pardo-avermelhada do fungo em hastes (d).

3.3.4. Controle

É importante impedir a introdução do patógeno na área de cultivo usando sementes certificadas, além de evitar a utilização de máquinas, implementos e água de irrigação que venham de áreas infestadas (BIANCHINI et al., 2005). O tratamento químico de sementes protege as plântulas nos estágios iniciais de desenvolvimento. Em áreas onde a doença já ocorre, a rotação de cultura com plantas não hospedeiras ajuda a diminuir quantidade de inóculo (BIANCHINI et al., 2005).

A correção do solo, de acordo com as recomendações, minimiza os sintomas da doença, pois aumenta a disponibilidade de nutrientes e estimula o desenvolvimento de agentes antagonistas (WORDELL FILHO et al., 2013).

A forma de controle mais econômica e eficaz é o emprego de genótipos resistentes (SARTORATO; RAVA, 1994). Contudo, são poucos os genótipos comercialmente disponíveis no mercado com amplo espectro de resistência.

3.4. INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

As plantas são frequentemente expostas a uma grande quantidade de patógenos, o que levou ao desenvolvimento de complexos mecanismos de defesa. De uma maneira geral, as plantas possuem mecanismos físicos e químicos pré-existentes, tais como: camadas de cera, cutícula, adaptações em estômatos e compostos fungitóxicos (AGRIOS, 2005). Além dos mecanismos pré-existentes, plantas possuem mecanismos que são ativados após o reconhecimento do patógeno, os quais envolvem a formação de tiloses, papilas, camadas de cortiça e de abscisão, produção de compostos como as fitoalexinas, proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas) e espécies reativas de oxigênio (Reactive Oxygen Species – ROS) (AGRIOS, 2005; GOZZO, 2003).

A ativação de mecanismos de defesa das plantas contra patógenos está relacionada com a capacidade de detectá-los (CLUZET et al., 2004). A percepção de moléculas sinalizadoras (chamadas de elicitores) geralmente iniciam com um influxo de cálcio e uma explosão oxidativa, seguido da síntese do ácido salicílico, ácido jasmônico e/ou etileno (CLUZET et al., 2004).

Uma ampla variedade de moléculas, incluindo oligo- e polissacarídeos algais, extratos de plantas e algas e produtos sintéticos podem induzir local e sistemicamente resistência contra patógenos (WALTERS et al., 2013). Segundo Cluzet et al. (2004), um elicitor em

potencial deve disparar várias respostas de defesa, não causar grandes alterações no metabolismo primário da planta e assegurar ampla proteção. Em termos gerais, a resistência induzida pode ser dividida em duas categorias: a resistência sistêmica adquirida (SAR) e resistência sistêmica induzida (ISR). A SAR pode ser induzida por tratamentos com uma variedade de agentes, incluindo certos produtos químicos (por exemplo, acibenzolar-*S*-methyl, ASM), caracteriza-se pelo acúmulo de PR-proteínas e é mediada por uma via dependente do ácido salicílico (WALTERS et al., 2013). As propriedades químicas permitem que o ácido salicílico realize várias atividades em reações e interações com enzimas e moléculas exercendo papéis importantes durante a SAR (GOZZO, 2003; WALTERS et al., 2013). O segundo tipo de resistência, conhecida como resistência sistêmica induzida (ISR), ocorre sistemicamente em resposta à colonização das raízes de plantas por certas bactérias promotoras de crescimento e é mediada por uma via envolvendo jasmonato e ou etileno e normalmente não envolve o acúmulo de PR-proteínas (WALTERS et al., 2013).

Raramente a resistência induzida controla completamente a doença, porém, reduz o tamanho e/ou número de lesões causadas pelo patógeno, levando assim, a um atraso em seu desenvolvimento (WALTERS et al., 2013). Seus princípios podem ser aplicados na proteção de plantas contra um amplo espectro de doenças causadas por fungos, bactérias e vírus (STADNIK; MARASCHIN, 2004).

3.5. USO DE INDUTORES DE RESISTÊNCIA

Os indutores de resistência podem ser classificados, quanto à origem, em: naturais ou sintéticos. Dentro dos indutores naturais, pode-se destacar a pré-inoculação com patógenos virulentos e avirulentos e a pulverização com trealose e polissacarídeos algais, tais como as carragenanas, laminaranas e ulvanas (WALTERS et al., 2013, STADNIK; DE FREITAS, 2014). Dentro dos indutores sintéticos, destaca-se a utilização de sacarina e compostos químicos tais como derivados do ácido salicílico, ácidos 2,6 dicloroisonicotínico e β -aminobutírico, probenazole e o acibenzolar-*S*-metil (ASM) (Bion®, Syngenta) (STADNIK; MARASCHIN, 2004, WALTERS et al., 2013).

O ASM, um análogo funcional do ácido salicílico (WALTERS et al., 2013), é comercializado no Brasil para controlar a antracnose, além de outras doenças causadas por bactérias e vírus na cultura do feijoeiro (MAPA, 2017).

A Sacarina (ortho sulphobenzamide) é um adoçante artificial utilizado em muitos alimentos e bebidas dietéticas e têm sido usado para induzir resistência em cereais e leguminosas contra um amplo espectro de patógenos (DELGADO et al., 2013). Curiosamente, é um dos mais principais metabolitos de probenazole, um fungicida triazol utilizado para estimular os mecanismos de defesa em plantas de arroz contra *Magnaporthe grisea* e cretamento bacteriano causada por *Xanthomonas oryzae* (IWATA, 2001). Na cultura do feijoeiro, a aplicação foliar de sacarina reduziu a severidade de ferrugem (*Uromyces appendiculatus*) em 70% (DELGADO et al. 2013).

A trealose (α -D-glucopyranosyl-[1-1]- α -Dglucopyranoside) é um açúcar não redutor constituído por duas unidades de glicose com ligação α 1-1. Foi descoberta pela primeira vez em *Claviceps purpurea* e, posteriormente, verificou-se que este açúcar é amplamente distribuído em muitos organismos, tais como fungos, plantas inferiores e invertebrados (REIGNAULT et al. 2001). Em plantas de trigo, a trealose reduziu a severidade de oídio (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*) em 50% e 95% com uma e três aplicações foliares, respectivamente (REIGNAULT et al. 2001).

O sistema de defesa de plantas também pode ser ativado pela aplicação de polissacarídeos algais. Assim, por exemplo, Mercier et al. (2001) observaram que, a aplicação de carragenana aciona diferentes sistemas de defesa em plantas de fumo, envolvendo as vias metabólicas de etileno, ácido jasmônico e ácido salicílico. Por outro lado, Sangha et al. (2010) demonstraram que a resistência de *Arabidopsis thaliana* induzida por λ -carragenana à *Sclerotinia sclerotiorum* correlaciona com a expressão de alguns genes da via de sinalização do ácido jasmônico, isto é, AOS, PDF1.2 e PR-3, bem como aumenta a atividade de oxalato oxidase. Além disso, λ -carragenana é capaz de induzir resistência em um mutante de *A. thaliana* deficiente em ácido salicílico (ics1), sugerindo que indução de resistência é independente deste (SANGHA et al., 2010).

As carragenanas são extraídas de algas vermelhas (*Rodophyta*) normalmente de *Kappaphycus alvarezii* (STADNIK; DE FREITAS, 2014). A carragenana é um polissacarídeo que compreende principalmente unidades de β -D-galactose e α -D-galactose, unidas por ligações glicosídicas α (1-3) e β (1-4) com grupos éster-sulfato e ligações anidro em diferentes posições (PRADO-FERNÁNDEZ et al., 2003). Os diferentes tipos de carragenanas podem ser distinguidos por suas estruturas primárias. Por isso, são geralmente distribuídas em três categorias comerciais denominadas κ -carragenana, ι -carragenana e λ -carragenana, as quais são classificadas de acordo com a presença de

ligações 3,6-anidro ligadas no resíduo de galactose e com a posição e o número de grupos sulfato. A κ -carragenana é composta de $\alpha(1-3)$ -Dgalactose-4 sulfato e $\beta(1-4)$ -3,6-anidro-D-galactose alternadas; a ι -carragenana é composta por $\alpha(1-3)$ -D-galactose-4 sulfato e $\beta(1-4)$ -3,6-anidro-D-galactose-2 sulfato alternadas e, a λ -carragenana é formada por $\alpha(1-3)$ -D-galactose-2 sulfato e $\beta(1-4)$ -D-galactose-2,6 sulfato alternadas (PRADO-FERNÁNDEZ et al., 2003; HILLIOU et al., 2006; VAN DE VELDE, 2008).

O extrato da alga marinha *L. digitata* contendo laminarana, um polissacarídeo de reserva de baixo peso molecular extraído de algas marrons e diatomáceas (CHIZHOV et al., 1998; LÉPAGNOL-DESCAMPS et al., 1998), é registrado (fora do Brasil) e comercializado, na forma líquida (40g de laminarana por litro de água) para induzir resistência contra doenças em trigo (*Triticum aestivum* L.), tais como Fusariose (*Fusarium graminearum*), oídio (*Blumeria graminis*) e septoriose (*Septoria nodorum*) (STADNIK; MARASCHIN, 2004).

Laminaranas são capazes de estimular reações de defesa em suspensões de células de diversas espécies vegetais, tais como fumo (*Nicotiana tabacum*) (KLARZYNSKI et al., 2000), videira (*Vitis vinifera*) (AZIZ et al., 2003) e arroz (*Oryza sativa*) (INUI et al., 1997). Estas respostas típicas incluem a ativação de proteínas quinases, influxo de Ca^{2+} , explosão oxidativa e alcalinização do meio extracelular, expressão de genes relacionados à defesa da planta, aumento da atividade de quitinase e glucanase e, a produção de fitoalexinas. Quando aplicada em fumo ou videira, a laminarana induz, sem desencadear reação de hipersensibilidade, o acúmulo de fitoalexinas e a expressão de um conjunto de proteínas PR (KLARZYNSKI et al., 2000; AZIZ et al., 2003). Isso acontece porque oligossacarídeos obtidos da laminarana mimetizam o ataque de um patógeno, pois estão naturalmente envolvidos nos mecanismos de reconhecimento celular, nas interações de planta-patógeno exógenas (resultantes da degradação das paredes celulares de fungos) ou endógenas (calose fragmentada no hospedeiro) (KLARZYNSKI et al., 2000).

Diversos trabalhos publicados até o presente momento demonstram que a ulvana tem potencial para controlar a ferrugem (*Uromyces appendiculatus*) (BORSATO et al., 2010), antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) (PAULERT et al., 2009; DE FREITAS; STADNIK, 2012) e o oídio (*Erysiphe. polygoni*) (JAULNEAU et al., 2011) do feijoeiro. Além disso, o polissacarídeo tem mostrado resultados promissores com outras espécies de plantas, tais

como em macieira no controle da mancha foliar de *Glomerella* (*C. gloeosporioides*) (ARAÚJO et al., 2008) em trigo (*Triticum aestivum*) e em cevada (*Hordeum vulgare*) contra o oídio (PAULERT et al., 2010) e em tomate (*Solanum lycopersicum*) contra *Fusarium* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) (EL MODAFAR et al., 2012).

A ulvana é composta por ramnose, xilose, glicose manose, galactose e ácidos urônicos (PAULERT et al., 2009). Estes açúcares estão estruturalmente agrupados em dois principais dissacarídeos repetitivos, os ácidos ulvanobiorônicos tipo A [(\rightarrow 4)- β -D-GlcA-(1 \rightarrow 4)- α -L-Rha 3S-(1 \rightarrow)] e tipo B [(\rightarrow 4)- α -L-IdoA-(1 \rightarrow 4)- α -L-Rha 3S-(1 \rightarrow)] (STADNIK; DE FREITAS, 2014)

Em experimentos conduzidos em casa-de-vegetação, a aplicação foliar preventiva de ulvana (10 mg mL⁻¹) reduziu a severidade da antracnose (*C. lindemuthianum*) em cerca de 50% e protegeu as plantas por até 9 dias após o tratamento (SCHONS et al., 2011). Considerando que a ulvana possui efeito sistêmico, mas não inibe o crescimento micelial e a germinação dos conídios do fungo *in vitro* e *in vivo*, o controle tem sido atribuído à indução de resistência na planta (PAULERT et al., 2009; DE FREITAS; STADNIK, 2012). De acordo com Cluzet et al. (2004), a aplicação preventiva de ulvana em plantas de alfafa elicita eficientemente múltiplas respostas de defesa em resposta à infecção por *Colletotrichum trifolii*. Estas respostas incluíram a biossíntese de fitoalexinas e de proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas) e, apresentaram sua máxima elicitação dois dias após a pulverização de 500 mg mL⁻¹.

Estudos tem demonstrado que a via de sinalização do ácido jasmônico está envolvida com a aplicação de ulvana (JAULNEAU et al., 2010). Por outro lado, a expressão da proteína relacionada à patogênese PR-1 (marcador da via do ácido salicílico) também tem sido observada (CLUZET al., 2004). Assim, pode-se sugerir que este polissacarídeo possa atuar em mais de uma via sinalização. De fato, o tratamento de plantas com ulvana tem induzido respostas de defesa contra patógenos biotróficos (PAULERT et al., 2010; JAULNEAU et al., 2011) hemibiotróficos (PAULERT et al., 2009; DE FREITAS; STADNIK, 2012) e necrotróficos (EL MODAFAR et al., 2012).

Compostos derivados da fermentação de algas marinhas têm sido usados como fertilizantes de plantas (UCHIDA; MIYOSHI, 20013), devido suas propriedades químicas e biológicas (CUOMO et al., 1995). No entanto, ainda existe uma falta de estudos contendo informações essenciais sobre o efeito desses compostos na atividade biológica em interações planta-patógeno.

4. CAPÍTULO 2 – SCREENING DE INDUTORES DE RESISTÊNCIA NO CONTROLE DA MURCHA DE FUSARIUM DO FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.)

Marlon C de Borba, Mateus B. de Freitas, Marciel J. Stadnik

Laboratório de Fitopatologia, Universidade Federal de Santa Catarina, 88034-001 Florianópolis, SC, Brasil.

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo avaliar o potencial de compostos bioativos e fermentados de algas marinhas no controle da Murcha de Fusarium (MF) do feijoeiro, causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (*Fop*), e seu efeito na emergência de plântulas. Inicialmente, quinze compostos foram testados em casa-de-vegetação usando tratamentos de semente, solo e folha. As sementes foram embebidas por 4 h antes da semeadura, enquanto que a irrigação do solo e a pulverização foliar foram realizadas aos 12 dias após a semeadura. Dentre os compostos testados, somente a ulvana reduziu a intensidade da doença quando pulverizada sobre as folhas e aumentou a emergência de plântulas quando embebida via semente. Em um segundo experimento, foi comparado o efeito da frequência de pulverizações de ulvana no progresso da doença e na colonização do fungo. Adicionalmente, foi testado o efeito do tratamento de semente com ulvana na emergência de plântulas em solo infestado com *Fop*, esterilizado/não-infestado e não-esterilizado/não-infestado. Uma, duas ou três aplicações de ulvana similarmente protegeram as plantas de feijão contra *Fop* até o terceiro trifólio totalmente expandido. A partir deste estágio, *Fop* eficientemente colonizou epicótilos de feijão independentemente do tratamento. A pulverização foliar de ulvana reduziu o progresso da doença comparado as plantas controle, mas não afetou a intensidade final no estágio de enchimento de vagens. Ulvana aumentou a emergência de plântulas em todas as condições testadas, mostrando ser um eficiente tratamento promotor de crescimento no feijão.

4.1. INTRODUÇÃO

A Murcha de *Fusarium* (MF), causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (*Fop*), é uma das principais doenças do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), especialmente em áreas de intensa monocultura (WORDELL FILHO et al., 2013). Os sintomas da doença incluem clorose, desfolha de folhas basais, necrose do tecido vascular, murcha e planta morta (XUE et al., 2015; DE BORBA et al., 2017). Embora o uso de genótipos resistentes seja a principal forma de controle, o lançamento de novas cultivares com amplo espectro de resistência tem sido dificultada pela variabilidade do patógeno (SALGADO; SCHWARTZ, 1993). Neste cenário, novas estratégias como a indução de resistência precisam ser consideradas para o manejo integrado da MF.

Uma ampla diversidade de moléculas, incluindo a trealose (REIGNAULT et al., 2001), polissacarídeos algais tais como as carragenanas (SANGHA et al., 2010), laminaranas (AZIZ et al., 2003), ulvanas (STADNIK; DE FREITAS), e produtos sintéticos como a sacarina (DELGADO et al., 2013) e o acibenzolar-*S*-methyl (ASM) (WALTERS et al., 2013) são usados para aumentar a resistência de plantas contra patógenos. O ASM, por exemplo, é recomendado para o controle da antracnose, do vírus do mosaico dourado e do cretamento bacteriano na cultura do feijão (MAPA, 2017). A pulverização foliar de ulvana, um polissacarídeo extraído de algas verdes do gênero *Ulva*, também tem mostrado resultados promissores no controle da antracnose (PAULERT et al., 2009; DE FREITAS; STADNIK, 2012), do oídio (JAULNEAU et al., 2011) e da ferrugem do feijoeiro (DELGADO et al., 2013). No tomateiro, a infiltração intermodal de oligoulvanas reduziu a severidade causada por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (EL MODAFAR et al., 2012).

Produtos derivados da fermentação de algas marinhas têm sido usados na agricultura como fertilizantes de plantas (UCHIDA; MIYOSHI, 2013). A fermentação de algas da espécie *Ulva rigida*, por 21 dias, tem demonstrado uso potencial no desenvolvimento de plantas pelas propriedades químicas e biológicas (CUOMO et al., 1995). No entanto, nenhuma informação é relatada na literatura sobre o efeito desses compostos na atividade biológica em interações planta-patógeno.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o potencial de compostos bioativos e fermentados de algas marinhas no controle da Murcha de *Fusarium* do feijoeiro, e seu efeito na emergência de plântulas.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

Plantas de feijão (*P. vulgaris* L.; cv. Uirapuru) suscetível a *Fop* (DE BORBA et al., 2017) foram utilizados nos experimentos. O isolado altamente agressivo (MANE 174) de *Fop* raça 6 (ALVES-SANTOS et al., 2002) foi mantido em solo naturalmente infestado em casa-de-vegetação. Amostras de *Ulva fasciata* Delile foram coletadas na praia da Armação em Florianópolis, SC, Brasil (27.4454°S; 48.2956°W).

Para o processo de fermentação, 300 g da alga seca (*U. fasciata*) foram misturadas em 2,7 L de água destilada em frascos de vidro com capacidade para 5 L, e incubados no escuro a $23 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 21 dias. A solução foi homogeneizada manualmente duas vezes por dia (60 s) usando uma espátula, e seu pH foi monitorado a cada dois dias. Amostras de 300 mL foram coletadas aos 7, 14 e 21 dias após a fermentação, filtrada para a remoção de fragmentos algais, e mantida a -20°C . Este extrato fermentado (EF) foi usado nos ensaios biológicos e parte foi separado para a precipitação do polissacarídeo em etanol (3:1; v/v; solução/álcool), chamado de ulvana derivada da fermentação (UF). O resíduo sólido restante da alga obtido aos 21 dias após a fermentação foi seco a 50°C por 72 h e usado para a extração da ulvana residual (UR), conforme descrito por Paulert et al. (2009).

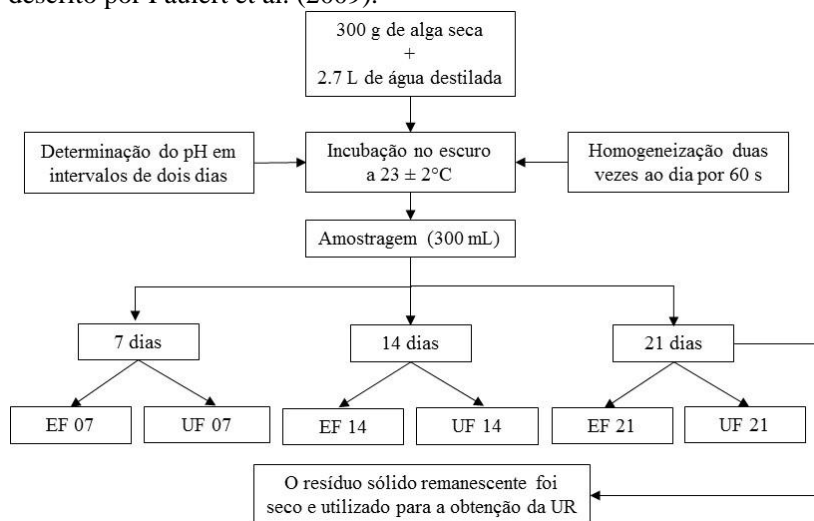


Figura 2.1. Diagrama mostrando como a fermentação foi realizada. EF = extrato fermentado. UF = ulvana derivada da fermentação. UR = ulvana residual.

A ulvana foi obtida de acordo com Paulert et al. (2009). Para isso, 100 g da alga seca foi autoclavada por 2 h a 110 °C, em 1 L de água destilada. A solução aquosa foi filtrada e o polissacarídeo foi precipitado pela adição de três volumes de etanol (96 °GL) a -20 °C durante 48 h. A ulvana foi seca em estufa a 40-45 °C por 72 h e, mantida em freezer a -20 °C até o uso nos ensaios biológicos.

ASM (Bion® 500 WG) foi obtido da Syngenta (São Paulo, Brasil), enquanto que ι-carragenana, λ-carragenana, laminarana, ramnose, sacarina e trealose da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil).

Antes do uso, os tratamentos foram completamente dissolvidos em água destilada sob contínua agitação em temperatura ambiente. A concentração dos tratamentos (Tabela 2.1) foi baseada na literatura e em testes preliminares de fitotoxicidade (ASM e sacarina), sobre plantas de feijão crescidas em casa-de-vegetação.

Para os experimentos, plantas de feijão foram cultivadas em uma mistura de solo argiloso e composto orgânico (3:1; v/v) naturalmente infestado com *Fop* ($3,9 \times 10^4$ unidades formadoras de colônias g⁻¹ de solo) em casa-de-vegetação (24 ± 3 °C e 12 h de fotoperíodo). As plantas foram irrigadas de acordo com seus requerimentos hídricos e fertilizadas no estágio de primeiro trifólio totalmente expandido (22 dias após a semeadura; DAS) com 25 mL de uma solução nutritiva contendo N, P₂O₅, Fe, Mn, Zn com 10,8, 8,8, 0,1, 7,0, e 2,5 mg L⁻¹, respectivamente.

Os compostos bioativos e fermentados de algas marinhas foram testados em casa-de-vegetação usando três metodologias de aplicação, por saber: embebição de sementes, irrigação do solo e pulverização foliar (Tabela 2.1). Antes do tratamento ou semeadura, as sementes foram superficialmente desinfestadas pela imersão em álcool 70% por 30 s, hipoclorito de sódio 0,5% por 2 min, e enxaguadas em água destilada. Para o tratamento de semente, sementes foram embebidas durante 4 h a fim de absorver as soluções (200 µL por semente), e então, semeadas em solo naturalmente infestado com *Fop*. Para os tratamentos de solo e folha, sementes não tratadas foram semeadas no solo, e quando as plântulas atingiram o estágio de primeira folha totalmente expandida (12 DAS), elas foram irrigadas com 5 mL ou pulverizadas (4 mL por planta) até o ponto de escorrimento superficial. Sementes ou plântulas tratadas com água destilada foram usadas como testemunhas.

Para o screening, os sintomas da MF foram avaliados aos 40 dias após o tratamento. A intensidade da doença de cada planta foi pontuada individualmente de acordo com escala de notas variando de 1 (sem sintomas da doença) a 9 (aproximadamente 75% ou mais das folhas e

ramos exibindo murcha, clorose e desfolhação, eventualmente planta morta) (VAN SCHOONHOVEN; PASTOR CORRALES, 1987).

Para avaliar o efeito da frequência da pulverização foliar de ulvana sobre o progresso da MF e na colonização do fungo, plantas de feijão foram pulverizadas uma (*i.e.*, 12 DAS), duas (*i.e.*, 12 e 15 DAS) ou três vezes (*i.e.*, 12, 15 e 18 DAS) com água (controle) ou ulvana (10 mg mL^{-1}). A intensidade da doença foi avaliada em intervalos de quatro dias, a partir dos aparecimentos sintomas (primeiro trifólio) até o estágio de enchimento de vagens (nove avaliações no total). A área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) foi calculada a partir dos dados da intensidade da doença (notas), utilizando-se a fórmula: $\text{AACPD} = \sum [((y_1 + y_2)/2) * (t_2 - t_1)]$, onde y_1 e y_2 são duas avaliações consecutivas da MF realizadas nos tempos t_1 e t_2 , respectivamente (CAMPBELL; MADDEN, 1990). A altura de planta foi determinada usando uma régua, medindo-se a distância deste a superfície do solo até o ponto máximo de crescimento. Adicionalmente, o número de plantas murchas e mortas foi contado. Por fim, o caule foi cortado longitudinalmente, e a necrose vascular da região do hipocótilo foi estimada percentualmente (DE BORBA et al., 2017).

Para comparar a colonização de *Fop* em plantas tratadas com água ou ulvana, foi quantificado o número de unidades formadoras de colônias (UFC) em tecidos do epicótilo coletados aos 12, 22, 32, 42, 52 e 62 DAS. Para obtenção das UFCs, amostras do tecido foram homogeneizadas em água destilada estéril (1:9; v/v), e sucessivamente diluídas até a concentração de 10^{-3} . Uma alíquota de $100 \mu\text{L}$ dessa última diluição foi distribuída, com auxílio de alça de Drigalski, em placa de Petri contendo meio de cultura batata dextrose ágar (BDA; 42 g L^{-1}) suplementado com pentacloronitrobenzeno (PCNB; 750 mg L^{-1}), estreptomicina (150 mg L^{-1}) e oxitetraciclina (15 mg L^{-1}) (LESLIE; SUMMRELL, 2006). Após um período de incubação de quatro dias a 25°C e 12 h de fotoperíodo, o número de UFC por grama de peso fresco foi calculado.

O screening dos compostos para a emergência de plântulas foi realizado em casa-de-vegetação usando o método de embebição de semente. Após o processo de embebição, duas sementes de feijão foram semeadas em potes de 0,2 L contendo solo infestado com *Fop*. O número de plântulas emergidas aos 10 DAS foi contado e estimado percentualmente. Esse efeito foi testado novamente em solo infestado com *Fop*, esterilizado/não-infestado e não-esterilizado/não-infestado. O solo esterilizado/não-infestado foi obtido pela autoclavagem a 120°C por 2 h, duas vezes, em um intervalo de dois dias. O pH do substrato foi ajustado para 6,5 pela adição de carbonato de cálcio ($0,5 \text{ g m}^{-3}$) e

carbonato de magnésio ($0,2 \text{ kg m}^{-3}$). Amostras do solo foram analisadas para confirmar a ausência do fungo. A emergência de plântulas foi determinada aos 10 DAS.

Os experimentos de screening para o controle da MF foram conduzidos em blocos inteiramente casualizados, com dois fatores: tratamentos (15 no total) e forma de aplicação (tratamento de semente, solo e folha). Três repetições foram usadas cada uma contendo 15 plantas. Para a emergência de plântulas, o screening foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com três repetições, cada um contendo trinta sementes. Os experimentos da frequência de pulverização de ulvana no progresso da MF e na colonização do fungo foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições, cada uma contendo 15 plantas. As UFCs foram baseadas em três repetições, cada uma contendo três plantas. Após a verificação da homogeneidade da variância dos dados, estes foram submetidos à análise de variância. Os testes de Scott-Knott e Tukey foram utilizados para a separação de médias ($P \leq 0,05$). O teste T de Student foi usado para fazer as comparações entre pares ($P \leq 0,05$). Relações entre os sintomas da MF ou a quantidade do patógeno (UFC) e os tempos avaliados foram analisados utilizando a inclinação (r) da regressão linear ($P \leq 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas usando o software Sisvar (v. 5.6). Os experimentos foram repetidos duas vezes, com resultados similares, e os valores apresentados neste estudo representam a sua média.

4.3. RESULTADOS

Uma interação significativa entre tratamentos e método de aplicação foi detectada nos experimentos de screening. Neste contexto, ulvana reduziu a intensidade da MF (40%) quando pulverizada sobre as folhas (Tabela 2.1). Sintomas típicos da doença foram observados aos 26 DAS (primeiro trifólio expandido) em plantas pulverizadas com água, e somente aos 32 DAS (terceiro trifólio expandido) naquelas tratadas com ulvana. Embora plantas pulverizadas com ulvana exibissem uma menor percentagem de murcha (69%), quando comparadas com plantas controle (91%), hipocótilos de ambos os tratamentos foram similarmente colonizados.

Nenhum dos tratamentos foi capaz de reduzir a severidade da doença quando embebidos pela semente ou irrigados via solo. Em plantas cujos tratamentos foram tratados pela semente, a intensidade da MF variou entre 5,7 e 7,3 com ASM, λ -carragenana e UR ou sacarina, respectivamente. Para o tratamento de solo, a severidade da doença variou

de 5,4 a 6,8 em plantas irrigadas com ι-carragenana e λ-carragenana ou laminarana e UR, respectivamente.

Tabela 2.1. Intensidade da Murcha de *Fusarium* em plantas de feijão aos 52 dias após a semeadura (terceiro trifólio totalmente expandido) em solo infestado com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em casa-de-vegetação tratadas com compostos bioativos e fermentados de algas marinhas.

Tratamento ^a	Concentração (mg mL ⁻¹)	Intensidade da doença (% em relação ao controle) ^{f,g}		
		Embebição da semente ^b	Irrigação do solo ^c	Pulverização foliar ^d
ASM	0,05 (i.a.)	92 aA	98 aA	105 aA
EF07	50 (ps)	106 aA	107 aA	98 aA
EF14	50 (ps)	94 aA	103 aA	113 aA
EF21	50 (ps)	105 aA	112 aA	98 aA
UF07	10	106 aA	93 aA	103 aA
UF14	10	95 aA	107 aA	113 aA
UF21	10	108 aA	95 aA	100 aA
ι-carragenana	1	95 aA	92 aA	103 aA
λ-carragenana	1	92 aA	92 aA	93 aA
Laminarina	1	98 aA	92 aA	95 aA
UR	10	92 aA	115 aA	92 aA
Ramnose	0,5	94 aA	112 aA	97 aA
Sacarina	0,24	119 aA	114 aA	98 aA
Trealose	15	93 aA	98 aA	90 aA
Ulvana	10	94 aA	103 aA	62 bB
Controle (1-9) ^e		6,2	5,9	6,1
CV (%)		13	13	12

^a ASM, acibenzolar-*S*-methyl; EF, extrato fermentado; UF, ulvana derivada da fermentação; UR, ulvana residual; i.a., ingrediente ativo; ps, peso seco.

^b Sementes foram embebidas (200 µL) por 4 h antes da semeadura.

^c Solo foi irrigado (5 mL) ou ^d plântulas foram pulverizadas (4 mL) aos 12 dias após a semeadura (primeiras folhas totalmente expandidas).

^e Intensidade da doença foi avaliada aos 52 dias após a semeadura (terceiro trifólio totalmente expandido) usando a escala de notas CIAT de 1 a 9.

^f Dados foram obtidos a partir de dois experimentos independentes, com resultados similares, cada um com três repetições (n = 45).

^g Letras maiúsculas e minúsculas indicam diferença significativa (teste de Scott-Knott, $P \leq 0,05$) na linha e na coluna, respectivamente.

Todas as plantas pulverizadas com água ou ulvana foram colonizadas por *Fop* e mostraram sintomas típicos da doença. Os primeiros sintomas em plantas tratadas com água foram observados aos 30 DAS, recebendo a nota de 8,1 aos 62 DAS. Nestas plantas, a altura de planta e a necrose vascular estimada aos 62 DAS foram 19 cm e 70%, respectivamente. Em média, a percentagem de murcha foi de 60% e planta morta de 40% (dados não mostrados).

Tabela 2.2. Emergência de plântulas de feijão aos 10 dias após a semeadura (primeiras folhas totalmente expandidas) em solo naturalmente infestado com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em casa-de-vegetação.

Tratamento	Emergência
ASM	54 b
EF07	61 b
EF14	56 b
EF21	57 b
UF07	64 b
UF14	62 b
UF21	52 b
ι-carragenana	55 b
λ-carragenana	57 b
Laminarina	54 b
UR	55 b
Ramnose	63 b
Sacarina	57 b
Trealose	67 b
Ulvana	89 a
Controle	61 b
Média geral	60
CV (%)	16

^a ASM, acibenzolar-*S*-methyl; EF, extrato fermentado; UF, ulvana fermentada; UR, ulvana residual; i.a., ingrediente ativo; ps, peso seco.

^b Sementes foram embebidas (200 µL) por 4 h antes da semeadura.

^c Dados foram obtidos a partir da média de dois experimentos independentes, cada um com três repetições (n = 90).

^g Letras minúsculas indicam diferença significativa (teste de Scott-Knott, $P \leq 0,05$).

Os primeiros sintomas em plantas tratadas com ulvana apareceram aos 34 e 38 DAS, com uma e duas/três aplicações, respectivamente. Embora a frequência de pulverizações de ulvana retardou o início dos primeiros sintomas, a intensidade final da doença foi similar as plantas controles. Em média, a incidência de murcha foi de 64% e de plantas mortas de 36%. Hipocótilos foram intensamente colonizados e mostraram uma necrose vascular de aproximadamente 60% (dados não mostrados).

Uma, duas ou três aplicações de ulvana significativamente reduziu a AACPD em comparação a plantas pulverizadas com água, mas não houve diferença entre frequências de pulverizações. Por outro lado, a taxa de progresso da doença foi significativamente maior em plantas tratadas com ulvana do que naquelas com água entre 42 e 58 DAS.

Uma redução no número UFC recuperado de epicótilos de plantas pulverizadas com ulvana foi observado até os 32 DAS em comparação aquelas tratadas com água. Contudo, a partir deste tempo, não foi observado diferença na quantidade de propágulos de *Fop* em epicótilos de ambos os tratamentos. Um incremento significativo na taxa de colonização foi observado no tempo estudado (dados não mostrados).

Sementes embebidas com água mostraram uma percentagem de emergência de 61%. Por outro lado, o tratamento com ulvana aumentou significativamente em 45% a emergência de plântulas quando comparada ao controle (Tabela 2.2). Esse efeito foi confirmado em um segundo experimento, aonde a embebição de sementes com ulvana foi capaz de aumentar a emergência em todas as condições testadas (*i.e.*; solo infestado com *Fop*, esterilizado/não-infestado, não-esterilizado/não-infestado).

4.4. CONCLUSÃO

Uma, duas ou três aplicações de ulvana similarmente protegeram as plantas de feijão contra *Fop* até o terceiro trifólio expandido. A partir deste estágio, *Fop* eficientemente colonizou epicótilos de feijão independentemente do tratamento. A pulverização foliar de ulvana reduziu o progresso da doença quando comparada as plantas controle, mas não afetou a intensidade final no estágio de enchimento de vagens. O presente trabalho também fornece evidências de que a ulvana pode aumentar a emergência de plântulas em feijão.

4.5. REFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAWI, G. S.; PASTOR-CORRALES, M. A. **Root Rots of Beans in Latin America and Africa: Diagnosis, Research and Methodologies and Management Strategies**. Cali, Colombia, 1990. 114 p.

ALVES-SANTOS, F. M. et al. Pathogenicity and race characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* isolates from Spain and Greece. **Plant Pathology**. v. 51, 605-611, 2002.

AMINI, J.; SIDOVICH, D. F. The effects of fungicides on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* associated with Fusarium wilt of tomato. **Journal of Plant Protection Research**. v. 50, 172-178, 2010.

AZIZ, A. et al. Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopora viticola*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 16, p. 1118-1128, 2003.

CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L.V. **Introduction to Plant Disease Epidemiology**. Wiley, New York, 1990.

CUOMO V., et al. Utilisation of *Ulva rigida* biomass in the Venice Lagoon (Italy): biotransformation in compost. **Journal of Applied Phycology**. V. 7, p. 479-485. 1995.

DE BORBA, M. C.; GARCÉS-FIALLOS, F. R.; STADNIK, M. J. Reactions of black bean seedlings and adult plants to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Crop Protection**. v. 96, 221-227, 2017.

DELGADO, D. Z.; DE FREITAS, M. B.; STADNIK, M. J. Effectiveness of saccharin and ulvan as resistance inducers against rust and angular leaf spot in bean plants (*Phaseolus vulgaris*). **Crop Protection**. v. 47, p. 67-73, 2013.

EL MODAFAR, C. et al. Induction of natural defense accompanied by salicylic acid-dependant systemic acquired resistance in tomato seedlings in response to bioelicitors isolated from green algae. **Scientia Horticulturae**. v. 138, p. 55-63, 2012.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The Fusarium Laboratory Manual**. Blackwell Publishing, Iowa, 2006. 387 p.

MAPA Resource database, 2017. **Agrofit - Sistema de agrotóxicos fitossanitários**.<http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 20 fev 2017.

SALGADO, M. O.; SCHWARTZ, H. F. Physiological specialization and effects of inoculum concentration of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* on common beans. **Plant Disease**. v. 77, 492-496, 1993.

SANGHA, J. S. et al. Sulfated macroalgal polysaccharides λ -carrageenan and ι -carrageenan differentially alter *Arabidopsis thaliana* resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v. 75, p. 38-45, 2010.

STADNIK, M. J.; DE FREITAS, M. B. Algal polysaccharides as source of plant resistance inducers. **Tropical Plant Pathology**. v. 39, 111-118, 2014.

UCHIDA, M.; MIYOSHI, T. Algal fermentation – The seed for a new fermentation industry of foods and related products. **Japan Agricultural Research Quarterly**. v. 47, 53-63, 2013.

VAN SCHOONHOVEN, A.; PASTOR-CORRALES, M. A. **Standard System for the Evaluation of Bean Germplasm**. Cali, Colombia, 1987. 54 p.

XUE, R. et al. Differentially expressed genes in resistant and susceptible common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes in response to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Plos One**. v. 10, e0127698, 2015.

WALTERS, D. R.; RATSEP, J.; HAVIS, N. D. Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. **Journal of Experimental Botany**. v. 64, 1263-1280, 2013.

WORDELL FILHO, J. A. et al. Manejo de doenças na cultura do feijão, in: WORDELL FILHO, J.A.; CHIARADIA, L.A.; BALBINOT, A. (Eds.), **Manejo Fitossanitário na Cultura do Feijão**. EPAGRI, Florianópolis, 2013, v. 1, 47 p.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho demonstrou que a pulverização foliar de ulvana pode reduzir a intensidade da Murcha de *Fusarium* em plantas de feijão até o estágio fenológico de terceiro trifólio totalmente expandido. A partir deste período, um forte progresso da doença parece estar associado com uma intensa colonização dos epicótilos por *Fop*. Desta forma, testar maiores intervalos entre as pulverizações de ulvana (7 ou 14 dias) a fim de se conseguir uma proteção durável parece ser um grande desafio para futuras pesquisas.

Nosso trabalho também fornece evidências de que a ulvana pode aumentar a emergência de plântulas de feijão quando embebida via semente. Esse tratamento poderia ser utilizado para aumentar o estande inicial de plântulas em áreas naturalmente infestadas com fungos de solo.

6. REFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA-GALLEGOS, J. A.; KELLY, J. D.; GEPTS, P. Prebreeding in common bean and use of genetic diversity from wild germplasm. **Crop Science**, v. 47, p. S44-S59, 2007.

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 2. ed. Burlington: Elsevier Academic Press, 2005, 922 p.

ARAUJO, L.; STADNIK, M. J.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M. Fosfito de potássio e ulvana no controle da mancha foliar a gala em macieira. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, p. 148-152, 2008.

AZIZ, A. et al. Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopora viticola*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 16, p. 1118-1128, 2003.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A. C.; CARNEIRO, S. M. P. G. Doenças do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). In: Kimati, H., Amorim, L., Rezende, J. A. M. Bergamin Filho, A. et al. (Eds) **Manual de Fitopatologia**, 4.ed. São Paulo, Ceres. v. 2, p. 333-349, 2005.

BORSATO, L. C.; DI PIERO, R. M.; STADNIK, M. J. Mecanismos de defesa elicitados por ulvana contra *Uromyces appendiculatus* em três cultivares de feijoeiro. **Trop Plant Pathology**, v. 35, p. 318-322, 2010.

BROUGHTON W. J. et al. Beans (*Phaseolus* spp) - model food legumes. **Plant and Soil**, v. 252, p. 55-128, 2003.

BURUCHARA, R. A.; CAMACHO, L. Common bean reaction to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, the cause of severe vascular wilt in Central Africa. **Journal of Phytopathology**, v. 148, p. 39-45, 2000.

CHIZHOV, A. O. et al. Structural analysis of laminarans by MALDI and FAB mass spectrometry. **Carbohydrate Research**, v. 310, p. 203-210, 1998.

CLUZET, S. et al. Gene expression profiling and protection of *Medicago truncatula* against a fungal infection in response to an elicitor from green

algae *Ulva* spp. **Plant, Cell and Environment**. v. 27, n. 7, p. 917–928, 2004.

CUOMO V., et al. Utilisation of *Ulva rigida* biomass in the Venice Lagoon (Italy): biotransformation in compost. **Journal of Applied Phycology**. V. 7, p. 479-485. 1995.

DE FREITAS, M. B.; STADNIK, M J. Race-specific and ulvan-induced defense responses in bean (*Phaseolus vulgaris*) against *Colletotrichum lindemuthianum*. **Physiological Molecular Plant Pathology**. v. 78, p. 8-13, 2012.

DELGADO, D. Z.; DE FREITAS, M. B.; STADNIK, M. J. Effectiveness of saccharin and ulvan as resistance inducers against rust and angular leaf spot in bean plants (*Phaseolus vulgaris*). **Crop Protection**. v. 47, p. 67-73, 2013.

ECHANDI, E. Amarillamiento del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) provocado por *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*. **Turrialba**. v. 17, n. 4, p. 409-410 1967.

EL MODAFAR, C. et al. Induction of natural defense accompanied by salicylic acid-dependant systemic acquired resistance in tomato seedlings in response to bioelicitors isolated from green algae. **Scientia Horticulturae**. v. 138, p. 55-63, 2012.

EMBRAPA. **Origem e história do feijão**. 2008. Disponível em: <<http://migre.me/7or1u>>. Acesso em: 02 nov. 2015.

FAO. **FAOSTAT**. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>>. Acesso em: 20 nov 2015 e 12 jun 2017.

GEISER; D. M. et al. One fungus, one name: Defining the genus *Fusarium* in a scientifically robust way that preserves longstanding use. **Phytopathology**, v. 103, n. 5, p. 400–408, 2013.

GLAZEBROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annual Review of Phytopathology**. v. 43, p. 205-227, 2005.

GOZZO, F. Systemic acquired resistance in crop protection: from nature to a chemical approach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 51, p. 4487-4503, 2003.

GRAHAM, P. H.; RANALLI, P. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Field Crops Research**, v. 53, n. 1-3, p. 131-146, 1997.

HEIL, M. Trade-offs associated with induced resistance. In: WALTERS, D.; NEWTON, A.; LYON, G. (Eds.). **Induced resistance for plant defence: a sustainable approach to crop protection**. Oxford: Blackwell Publishing. p. 157-177, 2007.

HILLIOU, L. et al. Effect of extraction parameters on the chemical structure and gel properties of κ /t- hybrid carrageenans obtained from *Mastocarpus stellatus*. **Biomolecular Engineering**. v. 23, p. 201-208, 2006.

IBGE. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Rio de Janeiro, 2015. 83 p.

INUI, H.; YAMAGUCHI, Y.; HIRANO, S. Elicitor actions of n-acetylchitooligosaccharides and laminarioligosaccharides for chitinase and l-phenylalanine ammonia-lyase induction in Rice suspension culture. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. v. 61, p. 975-978, 1997.

IWATA, M. Probenazole e a plant defense activator. **Pesticide Outlook**. v. 12, p. 28-31, 2001.

JAULNEAU, V. et al. Ulvan, a sulfated polysaccharide from green algae, activates plant immunity through the jasmonic acid pathway. **Journal of Biomed Biotech**. 525291, 2010.

JAULNEAU, V. et al. An *Ulva armoricana* extract protects plants against three powdery mildew pathogens. **European Journal of Plant Pathology**. v. 131, p. 393-401, 2011.

KLARZYNSKI, O. et al. Linear beta-1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. **Plant Physiology**. v. 124, n. 3, p. 1027-1038, 2000.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The Fusarium Laboratory Manual**. Blackwell Publishing, Iowa, 2006. 387 p

LÉPAGNOL-DESCAMPS, V. et al. Purification and determination of the action pattern of *Haliotis tuberculata* laminarinase. **Carbohydrate Research**. v. 310, p. 283-289, 1998.

MAPA Resource database, 2017. **Agrofit - Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 20 fev 2017.

MERCIER, L. et al. The algal polysaccharide carrageenans can act as an elicitor of plant defense. **New Phytologist**. v. 149, p. 43-51, 2001.

NELSON, P. E.; TOUSSON, T. A.; MARASAS, W. F. O. *Fusarium species*. **An illustrated manual for identification**. Pennsylvania: Pennsylvania State University, 1983. 193 p.

PASTOR-CORRALES, M. A.; ABAWI, G. S. Reactions of selected bean germplasms to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Plant Disease**. n.71, p. 990-993, 1987.

PAULA JÚNIOR, T. J. et al. Feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). EPAMIG: 101 Culturas: **Manual de Tecnologia Agrícola**. Belo Horizonte, p. 331-342, 2007.

PAULERT, R. et al. Effects of sulfated polysaccharide and alcoholic extracts from Green seaweed *Ulva fasciata* on anthracnose severity and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Plant Disease Protection**. v. 116, p. 263-70, 2009.

PAULERT, R. et al. Priming of the oxidative burst in rice and wheat cell cultures by ulvan, a polysaccharide from green macroalgae, and enhanced resistance against powdery mildew in wheat and barley plants. **Plant Pathology**. v. 59, p. 634-42, 2010.

PRADO-FERNÁNDEZ, J. et al. Quantitation of κ -, ι -, and λ -carrageenans by midinfrared spectroscopy and PLS regression. **Analytica Chimica Acta**, v. 480, p. 23-37, 2003.

REIGNAULT, P. et al. Trehalose induces resistance to powdery mildew caused by *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* in wheat. **New Phytologist**. v. 149, p. 519-529, 2001.

SANGHA, J. S. et al. Sulfated macroalgal polysaccharides λ -carrageenan and ι -carrageenan differentially alter *Arabidopsis thaliana* resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v. 75, p. 38-45, 2010.

SARTORATO, A.; RAVA, C. A. Murcha ou amarelecimento de Fusarium. In: (eds.). **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília, EMBRAPA-SPI. p.175-190, 1994.

SCHONS, R. F.; DE FREITAS, M. B.; STADNIK, M. J. Durabilidade da resistência induzida por ulvana e feito da concentração de inóculo no controle da antracnose do feijão. **Bioscience Journal**. v. 27, p. 544-551, 2011.

SILVA, H. T. **Agência de Informação Embrapa: Feijão - Morfologia**. 2011. Disponível em: <<http://migre.me/7qC7v>>. Acesso em: 20 nov 2015.

SILVEIRA, P. M.; STONE, L. F. **Cultivo de feijão irrigado na região nordeste de Minas Gerais**, 2005. Disponível em: <<http://migre.me/7pi7l>> Acesso em: 20 ago. 2016.

SINGH, U.; SINGH, B. Tropical grain legumes as important human foods. **Economic Botany**. v. 46, p. 310-321, 1992.

SINGH, S. P. Broadening the genetic base of common bean cultivars: A review. **Crop Science**. v. 41, p. 1659-1675, 2001.

STADNIK, M. J.; DE FREITAS, M.B. Algal polysaccharides as source of plant resistance inducers. **Tropical of Plant Pathology**. v. 39, p. 111-118, 2014.

STADNIK, M. J.; MARASCHIN, M. Indução de resistência de plantas a fitopatógenos. In: STADNIK, M. J.; TALAMINI, V. (Eds.). **Manejo ecológico de doenças de plantas**. Florianópolis: CCA/UFSC, p. 221-244. 2004.

STADNIK, M. J.; PAULERT, R. **Uso de macroalgas marinhas na agricultura**. Museu Nacional do Rio de Janeiro, v. 30, p. 267-279, Rio de Janeiro, 2008.

UCHIDA, M.; MIYOSHI, T. Algal fermentation – The seed for a new fermentation industry of foods and related products. **Japan Agricultural Research Quarterly**. v. 47, p. 53-63, 2013.

VILHORDO, B. W. et al. Morfologia. In: ARAUJO, R. S. et al. **Cultura do Feijoeiro Comum no Brasil**. Piracicaba: Potafos, 1996, p. 71-99

XUE, R. et al. Differentially expressed genes in resistant and susceptible common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes in response to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Plos One**. v. 10, e0127698, 2015.

WALTERS, D. R.; RATSEP, J.; HAVIS, N. D. Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. **Journal of Experimental Botany**. v. 64, p. 1263-1280, 2013.

VAN DE VELDE, F. Structure and function of hybrid carrageenans. **Food Hydrocolloids**. v. 22, p.727-734, 2008.

WORDELL FILHO, J. A. et al. Manejo de doenças na cultura do feijão, in: WORDELL FILHO, J.A.; CHIARADIA, L.A.; BALBINOT, A. (Eds.), **Manejo Fitossanitário na Cultura do Feijão**. EPAGRI, Florianópolis, 2013, v. 1, 47 p.